



Avaliação da heterogeneidade espermática de carneiros por meio da análise morfométrica computadorizada não automatizada utilizando-se preparação úmida e coloração de Karras

Evaluation of spermatic heterogeneity in ram with computerized non automatized morphometric analysis using humid preparation and Karras stain

T.M. Tremori^{1,3}, C.D. Monteiro-Toma², L. Rodello¹, S.D. Bicudo¹

¹Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Botucatu, SP, Brasil.

²Universidade de Cuiabá (UNIC), Cuiabá, MT, Brasil.

³Correspondência: talia_missen@hotmail.com

Resumo

A avaliação espermática é fundamental para resultados satisfatórios na biotecnologia da reprodução em ovinos. A heterogeneidade das células no ejaculado pode afetar o congelamento de sêmen e morfologias alteradas podem formar embriões de má qualidade. A análise do sêmen de 10 ovinos da raça Somalis demonstra que existe, entre as células espermáticas, variação na morfometria de nove dos 11 parâmetros avaliados na mensuração computadorizada não automatizada, ao comparar as técnicas utilizadas no trabalho (coloração de Karras sob microscopia óptica e preparação úmida sob microscopia de contraste de fase). As diferenças estatísticas entre a maioria dos parâmetros medidos tornam importante a busca por uma justificativa que possa esclarecer tal fenômeno com o objetivo de aprimorar e melhorar a qualidade da avaliação seminal, já que ela está diretamente relacionada com os índices de fertilidade nos ovinos.

Palavras-chave: coloração de Karras, ovino, preparação úmida, sêmen.

Abstract

Sperm evaluation is critical for satisfactory results in the biotechnology of reproduction in sheep breeding. The heterogeneity of cells in the ejaculate can affect semen freezing, and altered morphologies can produce bad quality embryos. The semen analysis of 10 Somalis ram found that there is variation between morphometric analysis of two techniques (staining Karras and wet preparation), finding statistical differences among most of the parameters measured. The semen analysis of 10 Somali sheep breed shows that there is variation among sperm cells in 9 of the 11 morphometric parameters evaluated in non-automated computed measurement comparing the techniques used (Karras staining under optical microscopy and wet preparation under phase contrast microscopy). Statistical differences between measured parameters is important to search for a justification that can clarify this phenomenon with the aim to enhance and improve quality of seminal review, since it is directly related to fertility rates in sheep.

Keywords: *Karras stain, semen, sheep, wet preparation.*

Introdução

O crescimento da ovinocultura torna necessários métodos cada vez mais eficazes para expandir a atividade. Nesse sentido as biotecnologias da reprodução são ferramentas fundamentais para melhorar a produção animal. Ovinos da raça Somalis são considerados de grande importância social e econômica, destacando-se como produtores de carne e pele (Simplicio et al., 1982; Silva et al., 1998). Os estudos relacionados a características espermáticas, inclusive heterogeneidade morfométrica, devem avançar para que ferramentas relacionadas à atividade reprodutiva otimizadoras do processo evoluam positivamente (Freitas-Dall'Aqua et al., 2009; Batista e Guerra, 2010).

As biotecnologias da reprodução estão continuamente em evidência, e a avaliação do ejaculado é uma etapa fundamental para que todo o processo, desde a coleta do sêmen até o nascimento do cordeiro, obtenha sucesso (Crespilho et al., 2009; Moura et al., 2010; Arruda et al., 2011).

O exame andrológico é composto de exame clínico do aparelho reprodutor, avaliação imediata do sêmen e patologias espermáticas (Brisola et al., 1999). Patologias espermáticas podem surgir antes mesmo de serem observadas alterações significativas na morfometria testicular. A avaliação do ejaculado é importante para que padrões fora da normalidade sejam observados e se caracterize a subfertilidade ou a infertilidade (Bicudo, 2000; Moreira et al., 2001; Rodello et al., 2011).



A maioria dos médicos veterinários à campo, ao realizar a avaliação andrológica, utiliza o método subjetivo, por meio de microscopia óptica, para análise do movimento dos espermatozoides. O método objetivo, que gera informações importantes a respeito do ejaculado e permite uma avaliação mais precisa da amostra quanto à qualidade do ejaculado, é o sistema computadorizado de análise espermática (ASMA; Verstegen et al., 2002; Cavalcante et al., 2005; Maroto-Morales et al., 2010). A correlação entre a motilidade e outras variáveis geradas pelo ASMA apresenta maior precisão, porém verifica-se inconsistência com a taxa de concepção, já que existem outros pré-requisitos fundamentais para que os espermatozoides concluam sua função biológica: a fertilização do ovócito (Gravance et al., 1995; Bearden e Fuquay, 2000).

A qualidade do esperma e a fertilidade podem estar associadas à população espermática. Quanto mais heterogênea, observam-se taxas mais baixas de sucesso na técnica de inseminação artificial (Sancho et al., 1998; García-Alvarez et al., 2010). A heterogeneidade morfométrica das células que compõem o ejaculado é um dos fatores que podem afetar significativamente o congelamento do sêmen ovino para sua posterior utilização. A morfologia alterada pode levar à diminuição da fertilidade, e anormalidades de cabeça podem acarretar formação de embriões de má qualidade (Gravance et al., 1998; Silva et al., 2008).

Os métodos de Karras e preparação úmida são utilizados para análise dos espermatozoides, porém, por serem técnicas diferentes, podem apresentar alterações em sua avaliação. Com base na premissa estabelecida em trabalhos anteriores acerca da análise morfométrica não computadorizada com o método de Karras (Monteiro et al., 2006), objetiva-se comparar a análise morfométrica de espermatozoides em preparação úmida visibilizados em contraste de fase e esfregaços de sêmen corados com o método de Karras (Papa et al., 1988), para, dessa forma, identificar a existência ou não de alterações que as células podem sofrer ao serem submetidas a cada tipo de processamento e, por fim, verificar se existe uma variabilidade estatística na morfometria.

Material e Métodos

Foram utilizados 10 ovinos machos, entre um e dois anos, da raça Somalis, os quais foram submetidos a exame clínico geral e andrológico individual. Foram realizadas coletas do sêmen por meio de vagina artificial. As amostras foram submetidas às avaliações mediatas: cor, aspecto, vigor, motilidade total, motilidade progressiva; e imediatas: concentração e morfologia espermáticas. Avaliaram-se ainda os parâmetros da cinética espermática por meio da análise computadorizada no Hamilton Thorn Motility Analyser HTMA (IVOS 12, Hamilton Research, Beverly, MA, USA).

Para a análise morfométrica utilizando a preparação úmida, foi pipetado na lâmina o sêmen diluído em glutaraldeído, colocado entre lâmina e lamínula e selado com esmalte, mediante visibilização em microscópio de contraste de fase. Também foi realizado esfregaço com o sêmen diluído em X-Cell® e corado com a técnica de Karras de cada amostra de sêmen; nesse método, a visibilização foi feita por meio de microscopia óptica.

Foram capturadas fotos de 100 células de cada lâmina com a câmera MEM 1300®, acoplada à objetiva do microscópio tanto de contraste de fase como óptico e conectada a um computador que, dessa forma, transmitia as imagens digitalizadas mediante a utilização do *software* Future WinJoe®; o aumento foi de 400X.

Para a avaliação morfométrica, os espermatozoides foram submetidos à análise computadorizada de imagens para morfometria utilizando-se “ImageJ®”, adequado para realizar o procedimento por meio de calibração de escala feita com imagens de lâminas de medidas em que uma certa distância em *pixels* corresponde a um determinado valor de micras. Como há diferença na execução da escala para os dois tipos de microscópio, foram analisados 100 espermatozoides de cada lâmina e de cada processamento.

Os parâmetros analisados foram: maior largura, largura de base, comprimento, área de cabeça, área do acrossomo, relação área do acrossomo/área da cabeça, comprimento da peça intermediária, toda extensão da cauda espermática, relação peça intermediária/cauda, comprimento total e relação largura da cabeça/comprimento da cabeça.

Após mensurar cada item, esses dados foram agrupados e avaliados estatisticamente, submetidos à análise de variância e comparados pelos método de Tukey a 5% de probabilidade (Cochran e Cox, 1976) entre os carneiros e entre as diferentes técnicas. Foi utilizado o test t para comparação das médias, considerando-se os parâmetros morfométricos dos espermatozoides já obtidos em trabalhos anteriores, o efeito do carneiro e a técnica utilizada.

Resultados

A avaliação dos ejaculados pertencentes aos 10 animais resultou nas seguintes características: odor *sui generis*, aspecto cremoso ou leitoso, coloração bege ou branca e volume variando entre 0,1 e 0,6 mL. Todos foram considerados aptos para a reprodução após realização de exame andrológico e para a análise no contexto da morfometria.

Por meio do agrupamento das mensurações realizadas conforme referido na metodologia, foi possível obter dados de comparação entre as duas técnicas, preparação úmida visibilizada em microscopia de contraste de fase e coloração de Karras visibilizada em microscopia óptica, conforme demonstrado na Tab. 1.



Tabela 1. Comparação entre métodos preparação úmida x coloração de Karras.

Variável	Preparação úmida com microscopia de contraste de fase*	Karras com microscopia óptica*	Valor de P **	Resultado
Largura maior da cabeça	4,644 ± 0,01	4,661 ± 0,01	0,2266	NS
Largura da base	2,216 ± 0,01	2,065 ± 0,01	<0,0001	S
Comprimento da cabeça	8,845 ± 0,01	8,576 ± 0,01	<0,0001	S
Área da cabeça	34,92 ± 0,12	33,21 ± 0,11	<0,0001	S
Área do acrossomo	19,09 ± 0,10	18,03 ± 0,09	<0,0001	S
Comprimento peça intermediária	15,96 ± 0,04	15,05 ± 0,04	<0,0001	S
Comprimento da cauda	58,71 ± 0,09	56,13 ± 0,09	<0,0001	S
Comprimento total	67,52 ± 0,10	64,65 ± 0,09	<0,0001	S
Relação peça intermediária/cauda	0,2723 ± 0,00	0,2684 ± 0,00	<0,0001	S
Relação área acrossomo/área da cabeça	0,5402 ± 0,002	0,5448 ± 0,002	0,2021	NS
Relação largura/comprimento da cabeça	0,5258 ± 0,001	0,5449 ± 0,001	<0,0001	S

*Média e erro-padrão, valores em μm . **Teste com 95% de significância. NS: não significativo. S: significativo.

Diante da análise estatística comparando o método da preparação úmida (primeiro valor) com o Karras (segundo valor), verificou-se que os parâmetros relação área acrossomo/área da cabeça ($0,54 \pm 0,00$ vs. $0,54 \pm 0,00$) e largura maior da cabeça ($4,64 \pm 0,01$ vs. $4,66 \pm 0,01$) não possuem diferença significativa entre as técnicas empregadas, uma vez que o valor de P foi maior que 0,05 (sendo utilizado teste t com 95% de significância).

Os demais parâmetros apresentaram os seguintes resultados: largura da base ($2,23 \pm 0,01$ vs. $2,06 \pm 0,01$); comprimento da cabeça ($8,84 \pm 0,01$ vs. $8,58 \pm 0,01$); área da cabeça ($34,92 \pm 0,12$ vs. $33,21 \pm 0,11$); área do acrossomo ($19,09 \pm 0,10$ vs. $18,03 \pm 0,09$); comprimento peça intermediária ($15,96 \pm 0,04$ vs. $15,05 \pm 0,04$); comprimento da cauda ($58,71 \pm 0,09$ vs. $56,13 \pm 0,09$) comprimento total ($67,52 \pm 0,10$ vs. $64,65 \pm 0,09$) relação peça intermediária/cauda ($0,27 \pm 0,00$ vs. $0,27 \pm 0,00$); relação largura/comprimento da cabeça ($0,53 \pm 0,00$ vs. $0,54 \pm 0,00$). Todas essas comparações apresentaram valor de P menor que 0,0001, comprovando que os valores são estatisticamente distintos.

Discussão

Os resultados demonstram diferenças significativas na mensuração morfométrica das células. Com isso, deve-se buscar uma justificativa que possa esclarecer qual tipo de mecanismo as distintas técnicas podem promover na célula espermática alterando a análise morfométrica. Levantou-se a hipótese de que, na preparação úmida, por estarem em uma solução isotônica, as células mantêm sua turgidez normal, mais próxima das dimensões encontradas naturalmente, já que os espermatozoides permanecem num meio fluido, enquanto a fixação de Karras, por necessitar de fixação em álcool, poderia promover a desidratação celular de suas reais dimensões.

As células submetidas à preparação úmida apresentaram valores significativamente maiores que as submetidas à coloração de Karras. É, portanto, importante posteriormente avaliar a influência que esse fenômeno pode causar na conclusão quanto à qualidade seminal e na alteração do congelamento do sêmen que é destinado a biotécnicas da reprodução. Também é interessante buscar uma maneira de facilitar o trabalho do profissional a campo, que, na maioria dos casos, não possui acesso a equipamentos restritos aos centros de pesquisa, de modo que seu exame não seja considerado inadequado pelo uso da técnica de coloração de Karras em microscopia óptica. Existe a possibilidade de, com o avanço dos estudos, elaborar um fator de correção que possa correlacionar as medidas obtidas para padronizar valores adequados de morfometrias espermáticas em ovinos.

Conclusões

O presente trabalho permite concluir que, por meio dos dados obtidos, os espermatozoides de carneiros da raça Somalis, quando comparados morfometricamente com o uso de preparação úmida sob microscopia de contraste de fase e esfregaço corado com Karras sob microscopia óptica, apresentam diferenças estatísticas diante da maioria dos parâmetros mensurados, demonstrando heterogeneidade entre as técnicas. Portanto, a técnica empregada influencia a análise da mensuração celular espermática, sendo este um fator que deve ser estudado mais profundamente a fim de justificar tal razão, considerando-se estudos de morfometria espermática em ovinos.



Agradecimentos

CNPq/PIBIC e Fazenda Duas Morenas, São Miguel Arcanjo, SP, Brasil.

Referências

- Arruda RP, Celeghini ECC, Alonso MA, Carvalho HF, Oliveira LZ, Nascimento J, Silva DF, Affonso FJ, Lemes KM, Jaimes JD.** Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. *Rev Bras Reprod Anim*, v.35, p.145-51, 2011.
- Batista AM, Guerra MMP.** New techniques for the assessment of goat semen quality: a review. *Rev Bras Reprod Anim*, v.34, p.125-132, 2010.
- Bearden HJ, Fuquay JW.** Applied animal reproduction. 5.ed. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, 2000. p.151-206.
- Bicudo SD.** Estudo da estacionalidade reprodutiva em carneiro ideal: níveis séricos de testosterona, androstenediona, triiodotironina, tiroxina, biometria testicular, avaliação das características do sêmen e de parâmetros indicativos de adaptação ao clima. 2000. 107f. Tese (Livre-docência) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP, 2000.
- Brisola LBN, Neves JP, Gonçalves PBD, Oliveira JFC, Montagner MM.** Integridade das membranas plasmática, nuclear e mitocondrial de espermatozoides ovinos criopreservados com etileno glicol. *Cienc Rural*, v.29, p.527-531, 1999.
- Cavalcante TV, Esper CR, Azevedo HC, Cordeiro MF.** Computer-assisted and conventional sperm motility analysis of boer and alpine goats semen in the autumn and spring. *Ars Vet*, v.21, supl., p.203-208, 2005.
- Cochran WG, Cox GM.** Experimental designs. 2.ed. New York: Wiley, 1992. 640p.
- Crespilho AM, Papa FO, Martins Junior A, Dell'Aqua Junior JA.** Evaluation of frozen bovine semen: How do semen collection and processing centers evaluate the quality of commercialized samples? *Vet Zootec*, v.16, p.335-342, 2009.
- Freitas-Dell'Aqua CP, Crespilho AM, Papa FO, Dell'Aqua Junior JA.** Metodologia de avaliação laboratorial de sêmen congelado bovino. *Rev Bras Reprod Anim*, v.33, p.213-222, 2009.
- García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Ramón M, del Olmo E, Montoro V, Dominguez-Rebolledo AE, Bisbal A, Jiménez-Rabadán P, Pérez-Guzmán MD, Soler AJ.** Analysis of selected sperm by density gradient centrifugation might AID in the estimation of in vivo fertility of thawed ram spermatozoa. *Theriogenology*, v.74, p.979-988, 2010.
- Gravance CG, Champion ZJ, Casey PJ.** Computer-assisted sperm head morphometry analysis (ASMA) of criopreserved ram spermatozoa. *Theriogenology*, v.49, p.1219-21, 1998.
- Gravance CG, Lewis KM, Casey PJ.** Computer automated morphometry analysis (ASMA) of goat spermatozoa. *Theriogenology*, v.44, p.989-91, 1995.
- Maroto-Morales A, Ramón M, García-Álvarez O, Soler A.J, Estes MC, Martínez-Pastor F, Pérez-Guzmán MD, Garde JJ.** Characterization of ram (*Ovis aries*) sperm head morphometry using the Sperm-Class Analyzer. *Theriogenology*, v.73, p.437-448, 2010.
- Monteiro CD, Bicudo SD, Toma HS, Azevedo HC, Rodello L, Sicherle CC.** Evaluation of sperm heterogeneity of sheep Santa Inês trough computerized morphometric analysis. *Acta Sci Vet*, v.34, supl. 1, p.379, 2006.
- Moreira EP, Moura AAA, Araújo AA.** Efeitos da insulação escrotal sobre a biometria testicular e parâmetros seminais em carneiros da raça Santa Inês criados no Estado do Ceará. *Rev Bras Zootec*, v.40, p.1704-1711, 2001.
- Moura PP, Franco MM, Silva TASN, Rocha TL, Leal DR, Passos PIB, Neves JP.** Caracterização de proteínas do plasma seminal e sua relação com parâmetros de qualidade do sêmen criopreservado de ovinos. *Cienc Rural*, v.40, p.1154-1159, 2010.
- Papa FO, Bicudo SD, Alvarenga MA, Ramires PRN, Carvalho IM, Lopes MD.** Coloração espermática segundo KARRAS, modificada pelo emprego de barbatimão (*Stryphnodendrum barbatimam*). *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.40, p.115-123, 1988.
- Rodello L, Bicudo SD, Falleiros MB, Monteiro CD, Sakashita SM.** Implicações da redução na concentração de gema de ovo no meio glicina-gema-leite sobre a cinética, morfologia e integridade de membranas espermáticas em sêmen ovino criopreservado. *Vet Zootec*, v.18, p.239-248, 2011.
- Sancho M, Pérez-Sánchez L, Tablado L, de Monserrat JJ, Soler C.** Computer assisted morphometric analysis of ram sperm heads: evaluation of different fixative techniques. *Theriogenology*, v.50, p.27-37, 1998.
- Silva LM, Silva CMG, Cavalcante TV, Ferreira JL, Souza JAT.** Utilização do corante rosa bengala no método de preparação úmida para avaliação morfológica de sêmen ovino. *Rev Cient Prod Anim*, v.10, p.174-180, 2008.
- Silva FLR, Araújo AM, Figueiredo EA.** Características de crescimento e de reprodução em ovinos Somalis no



Tremori et al. Avaliação da heterogeneidade espermática de carneiros através da análise morfométrica computadorizada não automatizada utilizando-se preparação úmida e coloração de Karras.

Nordeste brasileiro. Rev Bras Zootec, v.27, p.1107-1114, 1998.

Simplicio AA, Riera, GS, Figueiredo EAP, Nunes JF. Desempenho produtivo de ovelhas da raça Somalis brasileira no Nordeste do Brasil. Pesq Agropec Bras, v.17, p.1795-1803, 1982.

Verstegen J, Iguer-Quada M, Onclin K. Computer assisted sêmen analyzers in andrology research and veterinary practice. Theriogenology, v.57, p.149-79, 2002.
